Çeşitli Ticari Alkol Bazlı El Antiseptikleri ve Dünya Sağlık Örgütü'nün Önerdiği Formülasyon-II'nin Antibakteriyel Etkinliğinin EN 1500 Standardı ile Test Edilmesi

Testing the Antibacterial Efficacy of Various Commercially Available Alcohol-based Hand Antiseptics and The World Health Organization Formulation II with the EN 1500 Standard

Tuncay Topaç[1], Cüneyt Özakın[2]

[1]Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikoloji, Şanlıurfa, Türkiye; [2]Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Bursa, Türkiye

ÖZET

Amaç: Kullanımı yaygınlaşan el antiseptiklerinin antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilmesi için geliştirilmiş olan European Norm (EN) 1500 standardı Avrupa'da kullanılan en yaygın *in vivo* test metodudur ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından da kabul edilerek TSE EN 1500 olarak yürürlüğe konmuştur. Bu çalışmada; piyasadan temin edilen beş antiseptik ürünün ve Dünya Sağlık Örgütü'nün önerdiği el antiseptik formülasyonu-II (DSÖ-II)'nin EN 1500 standardı ile iki farklı uygulama şeklinin test edilmesi hedeflendi.

Yöntemler: Test edilen antiseptiklerin ilk uygulama şekli, ellerin 3 mL antiseptik ile 30 saniye süre ile ovalanması şeklinde (1x3 mL; 30 sn) iken; ikincisi 3 ml antiseptik ile 30 saniye el ovalandıktan sonra aynı işlemin 3 ml antiseptikle 30 saniye daha tekrar edilmesi (2x3 ml; 2x30 sn) şeklinde toplam 60 saniyelik bir uygulamadır. Standardın belirlediği şekilde, gönüllü katılımcıların elleri *Escherichia coli* K-12 standart suşu ile yapay olarak kontamine edildikten sonra test edilen antiseptiklerin bakterisidal etkinliği, referans prosedür olan hacimce %60 izopropil alkol solüsyonunun "2x3 mL; 2x30 sn" şeklinde uygulanması ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Beş adet ticari antiseptik ürün ve DSÖ-II formülasyonu "1x3 ml; 30 sn" şeklinde uygulandıklarında referans prosedürden anlamlı derecede daha az etkin bulunup EN 1500 standardını sağlayamazken "2x3 ml; 2x30 sn" şeklinde uygulandıklarında hepsi de EN 1500 standardını sağladı.

Sonuç: EN 1500 standardının gereğini sağlayacak düzeyde antisepsi sağlamak amacıyla test edilen antiseptik ürünler ve DSÖ-II formülasyonu "2x3 ml; 2x30 sn" şeklinde uygulanmalıdır. Pratikte 60 saniyelik sürenin uzunluğu göz önüne alındığında 30 saniyede yeterli el antisepsisi sağlanması için alkol oranının yükseltilmesi düşünülmelidir.

Anahtar Kelimeler: El antiseptikleri, DSÖ el antiseptik formülasyonu, EN 1500, antibakteriyel etkinlik

ABSTRACT

Objective: The European Norm (EN) 1500 standard, which was developed to evaluate the antibacterial efficacy of widely used hand rub agents, is the most common in vivo test method used in Europe and has been accepted by the Turkish Standards Institute. This study aimed to test five antiseptic products supplied from the market and the hand antiseptic formulation II recommended by the World Health Organization (WHO-II) for two application types using the EN 1500.

Methods: In the first application, the hands were rubbed with 3 mL of antiseptic for 30 seconds (1x3 ml; 30 sec); in the second application, which lasted 60 seconds, the hands were rubbed with 3 ml of antiseptic for 30 seconds, and the same process was repeated once more (2x3 ml; 2x30 sec). After the participants' hands were artificially contaminated with *Escherichia coli* K12 standard strain, the bactericidal efficacy of the tested antiseptics was compared with the application of a 60% by volume isopropyl alcohol solution (2x3 ml; 2x30 sec) as the reference procedure.

Results: When the antiseptics were tested, and WHO-II was applied in the form of "1x3 ml; 30 sec", they were found to be significantly less effective than the reference procedure and did not meet the EN 1500. On the other hand, when they were applied in the "2x3 ml; 2x30 sec" procedure, all of them met the EN 1500.

Conclusion: Tested antiseptic products and WHO-II should be applied in the form of "2x3 ml; 2x30 sec" to meet the EN 1500. Considering the length of the 60-seconds period in practice, raising the alcohol ratio should be considered in order to provide adequate hand antisepsis in 30 seconds.

Keywords: Hand antiseptics, WHO-recommended hand rub formulation, EN 1500, antibacterial efficacy

Cite this article as: Topaç T, Özakın C. [Testing the antibacterial efficacy of various commercially available alcohol-based hand antiseptics and the World Health Organization formulation II with the EN 1500 standard]. Klimik Derg. 2022;35(2):84-9. Turkish. **Sorumlu Yazar / Correspondence:** Tuncay Topaç, **E-posta / E-mail:** tuncay.topac@hotmail.com, **Geliş / Received:** 03 Eylül / September 2021, **Kabul / Accepted:** 05 Aralık / December 2021, **Yayın Tarihi / Published Date:** 23 Mayıs / May 2022, **DOI:** 10.36519/kd.2022.4005

GİRİŞ

Hijyenik el antisepsisi, ellerdeki geçici floranın kalıcı florayı etkilemeden azaltılması amacıyla uygulanan el yıkama ya da el ovalama işlemleri olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün sağlık hizmetlerinde el hijyeni konulu kılavuzunda; ellerin görünür olarak kirli olduğu, kan ve vücut sıvıları bulaştığı durumlarda, tuvaleti kullandıktan sonra ve *Clostridium difficile* salgınlarında olduğu gibi ispatlanmış ya da muhtemel spor oluşturan patojen maruziyetinde ellerin su ve sabunla yıkanması, bunlar dışında kalan rutin el antisepsisi uygulamalarında ise tercihan alkol bazlı el antiseptikleri ile el ovalama önerilmektedir (1). Alkol bazlı el antiseptikleri mikroorganizmalar üzerinde daha etkili olup daha az zaman gerektirmekte, sağlık çalışanlarının el hijyenine uyumunu arttırmakta ve sabunla el yıkamaya göre elleri daha az tahriş etmektedir (2). Alkol bazlı el antiseptiklerinin, nozokomiyal infeksiyon ve çapraz geçiş hızlarında azalma gibi parametrelerle ifade edilen etkiliklerini gösteren saha çalışmaları da yapılmıştır (3-5).

Kullanımı yaygınlaşan el antiseptiklerinin değerlendirilmesi için uluslararası standartların uygulanmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Ovalama şeklinde uygulanan hijyenik el antiseptiklerinin değerlendirilmesi için Avrupa Standartlar Komitesi (European Committee for Standardization-CEN) tarafından geliştirilen EN 1500 standardı (6) Avrupa'da kullanılan en yaygın *in vivo* test metodudur ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından da kabul edilerek TSE EN 1500 olarak yürürlüğe konmuştur. EN 1500 standardı ovalama şeklinde uygulanan el antiseptiklerinin gerçek kullanım şartlarındaki bakterisidal etkinliğini değerlendirmek için gönüllülerin ellerinin kullanıldığı kantitatif bir testtir.

DSÖ, kaynakların sınırlı olduğu ve temiz suya ulaşmanın zor olduğu gelişmekte olan ülkelerde kullanılmak üzere lokal üretime uygun iki antiseptik formülasyon önermiştir (7). Bunlardan ilki olan DSÖ-I hacimce (v/v) %80 etil alkol bazlı olup ikincisi olan DSÖ-II hacimce (v/v) %75 izopropil alkol bazlıdır. Koronavirus hastalığı (COVID-19) pandemisinin özellikle başlarında antiseptik ürün temini ndeki sıkıntılar, dikkatleri bu formülasyonların üzerine çekmiştir. Hastanelerde artan antiseptik kullanımının yanı sıra, toplumda alkol bazlı el antiseptiklerine artan talebin ticari ürünlerle karşılanamaması nedeniyle DSÖ formülasyonları hastanelerde kullanılmak üzere dünya genelinde üretilmiştir (8, 9).

Çalışmanın yapıldığı Mart 2013 tarihinde, beş adet ticari antiseptik ürün ve DSÖ-II formülasyonunun etkinliği EN 1500 standardına göre test edildi. COVID-19 pandemisiyle birlikte kullanımı yaygınlaşan antiseptik ürünlerin ve daha etkili kullanım için önerilen formülasyon ve uygulama şekli değişikliklerinin standartlara göre değerlendirilmesi günümüzde daha fazla önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda elde edilen verileri gözden geçirerek güncel değişiklikler ışığında konuya dikkat çekmek istedik.

YÖNTEMLER

Test Edilen Antiseptikler

Piyasadan temin edilen ürünler çalışmamızda markalarından bağımsız, içeriklerine özgü olarak A, B, C, D ve E harfleri ile ifade edildi. DSÖ-II formülasyonu kılavuzda belirtildiği şekilde hazırlandı; aktif madde olarak %75 (v/v) izopropil alkol, kontaminan bakteri sporlarını inaktive etmek için % 0.125 hidrojen peroksit (v/v) ve nemlendirici olarak %1.45 (v/v) gliserol kullanıldı (7). Test edilen antiseptik ürünlerin içerdiği aktif maddeler Tablo 1'de verildi.

Gönüllüler

Laboratuvar personeli arasından seçilen 15 gönüllünün katılımı ile test gerçekleştirildi. Çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 26 Mart 2013 tarih ve 2013-6/5 sayılı karar numarasıyla onaylandı. Gönüllülere çalışma hakkında bilgi verilerek, yazılı onayları alındı; sağlıklı olmalarına, ellerinde kesik-yara olmamasına ve tırnaklarının uzun olmamasına dikkat edildi.

Tablo 1. Test Edilen Antiseptik Ürünlerin İçerdiği Aktif Maddeler

Antiseptikler	Aktif Maddeler
A	%70 İzopropil alkol*
B	%60 (w/w) İzopropil Alkol %0.15 (w/w) Benzalkonyum Klorür %0.1 (w/w) Undesilenik Asit
DSÖ-II	%75 (v/v) İzopropil Alkol, %0.125 (v/v) Hidrojen Peroksit
C	%70 (v/v) İzopropil Alkol
D	%70 (v/v) Etil Alkol, %10 (v/v) İzopropil Alkol
E	%63.14 (w/w) İzopropil Alkol

*Hacim ya da ağırlık yüzdesi belirtilmemiştir.
w/w: Ağırlıkça yüzde, **v/v:** Hacimce yüzde

EN 1500 Standardı

Bu testte, gerçek hayatta sağlık çalışanlarının ellerine bulaşan bakterileri temsilen katılımcıların elleri *E. coli* K-12 (NCTC 10538) standart suşundan hazırlanan bir süspansiyon ile yapay olarak kontamine edilmektedir. Kontaminasyon sıvısı, 2 x 10^8 – 2 x 10^9 kob/ml (koloni oluşturan birim/mililitre) bakteri içermelidir. Bunun için bakteri yoğunluğu nefelometrik olarak 1 McFarland'a ayarlanır. Doğrulama amacıyla elde edilen kontaminasyon sıvısının 10^{-6} ve 10^{-7} dilüsyonları hazırlanıp her bir dilüsyondan ikişer sayım plağına birer mililitre aktarılır ve drigalski spatülü kullanılarak yayma plak yöntemi ile koloni sayım ekimleri yapılır. Sayım plağı olarak 150 mm çaplı petride tripton soya agar (TSA) besiyeri kullanılır. Sayım plakları 24-48 saat 37 ^{0}C'de inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapılarak kob/ml değerinin uygun aralıkta olduğu gösterilir. Yapay kontaminasyon sonrası başlangıç bakteri sayısının belirlenmesi için elden ilk numuneler alınmaktadır. Test edilen antiseptik maddenin uygulanmasından sonra kalan bakteri sayısının belirlenmesi için de elden son numuneler alınmaktadır. Bakteri sayısında antiseptik uygulaması sonucu gözlenen azalma logaritmik (log_{10}) olarak ifade edilir. Bu değer logaritmik azaltma faktörü (log AF) olarak isimlendirilmiş olup antiseptiğin bakterisidal etkisi ile orantılıdır. Test edilen antiseptiğin standart tarafından belirtilmiş referans solüsyon olan %60 (v/v) izopropil alkol ile karşılaştırılması için bütün gönüllüler hem referansı hem de test edilen antiseptiği denerler. Her bir katılımcıdan referans ve test edilen ürün için elde edilen log AF değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırması yapılır. Katılımcıların sağ ve sol elleri için log AF değerleri ayrı ayrı hesaplanarak metodun istatistiksel kesinliği artırılmaktadır. Bir ürünün standardı sağlayabilmesi için etkisinin referanstan anlamlı olarak düşük olmaması gerekmektedir.

Deney Düzeneği

Altı adet antiseptik iki farklı uygulama şekli için toplam dört deney setinde 15 gönüllünün katılımı ile test edildi. Uygulama şekillerinden biri 3 ml antiseptiğin, 30 saniyelik el ovalama süresi ile uygulanması (1x3 ml; 30 sn), diğeri ise 3 ml antiseptiğin 30 saniye ovalama süresi ile uygulandıktan sonra ikinci 3 ml antiseptik ile aynı işlemin bir kez daha tekrar edildiği toplam 60 saniyelik uygulamadır (2x3 ml; 2x30 sn). Gönüllüler el antiseptiklerini EN 1500'de tanımlanan standart el ovalama prose-

Tablo 2. Set 1 Çalışmasında Uygulanan Latin Kare Dizaynı

	Deney 1	Deney 2	Deney 3	Deney 4
Grup 1	A	B	DSÖ-II	R
Grup 2	B	DSÖ-II	R	A
Grup 3	DSÖ-II	R	A	B
Grup 4	R	A	B	DSÖ-II

R: Referans solüsyon (%60 v/v izopropil alkol)

düründe göre uyguladı. Her bir set ayrı bir günde yapılmış olup bütün gönüllülere 3 adet antiseptik iki uygulama şeklinden biri ile uygulandı. Bütün setlere aynı gönüllüler katıldı ve her sette test edilen antiseptiklerle birlikte referans solüsyon da uygulandı. Referans solüsyon olan %60 (v/v) izopropil alkol bütün setlerde standartta tanımlandığı gibi 60 saniye uygulandı (2x3 ml; 2x30 sn). Deney setlerinde test edilen antiseptikler ve uygulama şekilleri aşağıdadır:

Set 1: A, B ve DSÖ-II; "1x3 ml; 30 sn"

Set 2: A, B ve DSÖ-II; "2x3 ml; 2x30 sn"

Set 3: C, D, E; "1x3 ml; 30 sn"

Set 4: C, D, E; "2x3 ml; 2x30 sn"

Her bir sette, bütün gönüllülerin 3 adet antiseptiği ve referans solüsyonu (R) kullandıkları bir Latin kare dizaynı uygulandı. Bunun için gönüllüler dört gruba ayrıldı (4+4+4+3 kişi) ve böylece her bir set dört deney yapılarak tamamlandı. Set 1'de uygulanan Latin kare dizaynı Tablo 2'dedir.

Kullanılan Besiyeri ve Nötralizanlar

Tripton soya "broth" (TSB) (Oxoid, İngiltere), kontaminasyon sıvısının hazırlanması ve ilk değer numunelerinin elde edilmesi için kullanıldı. Kontaminasyon sıvısını elde etmek için 2 litre steril besiyerinde üretilen *E. coli* K-12 (NCTC 10538) standart suşunun nefelometrik olarak 1 McFarland'lık süspansiyonu hazırlandı. Bakteri yoğunluğunun istenen aralıkta olduğunu göstermek için uygun dilüsyonlardan koloni sayım ekimleri yapıldı. Bir deney setinde bütün gönüllüler aynı kontaminasyon sıvısını kullandı. Farklı günlerde gerçekleştirilen her bir deney seti için yeni kontaminasyon sıvısı hazırlandı. İlk değer numunelerinin elde edileceği steril 90 mm'lik petri kutularının içine 10'ar ml TSB dağıtıldı. Nötralizanlı tripton soya "broth" (NTSB) hazırlamak için; 40 g Tween 80 (Merck, Almanya), 15 g tripton, 5 g NaCl ve 5 g bakteriyolojik pepton (Oxoid, İngiltere) distile su ile 950 ml'ye tamamlanarak otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklığı 50°C'ye düşünce karışımın içine önceden hazırlanmış ve zarından ayrılmış olan steril yumurta sarısından 50 ml ilave edilerek manyetik karıştırıcıda bir saat kadar karıştırıldı. Elde edilen nötralizanlı besiyerinin sterilite kontrolü yapıldıktan sonra standartta tanımlandığı şekilde validasyonu yapıldı. Çalışmada NTSB, son değer numunelerinin elde edileceği steril petri kutuları içine 10'ar ml dağıtıldı. Tripton soya agar (TSA) besiyerinin (Oxoid, İngiltere) litresine 0.5 g sodyum deoksikolat (AppliChem, Almanya) ilave edilerek elde edilen sodyum deoksikolatlı TSA, ilk değer ve son değer numunelerinin dilüsyonlarından yapılan koloni sayım ekimlerinde kullanıldı.

EN 1500 Standart Metodunun Aşamaları

Gönüllüler ellerini basit sıvı sabunla bir dakika boyunca yıkar. Böylece ellerdeki geçici flora uzaklaştırılır. Kâğıt havlu ile kurulamayı takiben; eller 5 saniye süreyle kontaminasyon sıvısına mid-metakarpal seviyesine kadar daldırılır. Kontaminasyon sıvısından çıkarılan eller parmaklar aralık olacak şekilde üç dakika boyunca havada kurutulur. İçerisinde 10 ml TSB bulunan 90 mm çapındaki steril petri kutularının içine parmak uçları daldırılarak bir dakika boyunca ovuşturma hareketi yapılır. Böylece yapay olarak kontamine edilmiş olan ellerdeki bakteri yoğunluğunu yansıtan ilk değer numuneleri elde edilmiş olur. Takibinde, gönüllülerin ellerine test edilecek antiseptik ürün (ya da referans solüsyon) belirlendiği şekilde uygulanır. Uygulama sonrası eller beş saniye süre ile akan musluk suyu altından geçirilir ve parmak uçları içerisinde 10'ar ml NTSB içeren petri kutularına daldırılarak bir dakika boyunca ovuşturma hareketi yapılır. Bu aşamada, sıvı besiyerinin dilüsyon etkisi ve ilave edilen nötralizanların eldeki antiseptik kalıntılarının etkisini durdurması amaçlanmaktadır. Böylece antiseptik uygulanması sonrası elde kalan bakterilerin sayısının (son değer) hesaplanmasında kullanılacak son değer numuneleri elde edilmiş olur. İlk değer ve son değer numuneleri elde edilirken sağ ve sol eller için ayrı petri kutuları kullanılır. Elde edilen numunelerin gerekli dilüsyonları yapılarak sodyum deoksikolatlı TSA besiyerlerine koloni sayım ekimleri yapılır. Bir deney setinde her bir gönüllünün test edilen üç antiseptik ve referans solüsyon için ayrı ayrı logaritmik azaltma faktörleri (log AF) aşağıdaki şekilde hesaplanmaktadır.

$$\text{log AF} = \text{log ilk değer} - \text{log son değer}$$

$$\text{log ilk değer} = [\log_{10}(\text{sağ el ilk değer}) + \log_{10}(\text{sol el ilk değer})] / 2$$

$$\text{log son değer} = [\log_{10}(\text{sağ el son değer}) + \log_{10}(\text{sol el son değer})] / 2$$

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS ("Statistical Package for the Social Sciences") versiyon 20.0 programı (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) ile yapıldı. Elde edilen log AF değerlerinin karşılaştırılması için standartta önerildiği şekilde Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanıldı. P değeri (tek yönlü) <0.1 olarak anlamlı kabul edildi. Her bir set, farklı günlerde çalışıldığı için deney şartlarının değiştiği düşünülerek, Wilcoxon işaretli sıralar testi ile kendi içinde değerlendirildi.

BULGULAR

Set 1, 2, 3 ve 4 çalışmasından elde edilen ortalama log AF değerleri ve standart sapmaları Tablo 3'te verilmiştir. Set 1 ve 3 çalışmalarında test edilen antiseptikler "1x3 ml; 30 sn" şeklinde uygulandı. Wilcoxon testi sonucunda A, B, C, D, E antiseptikleri ve DSÖ-II formülasyonu bu şekilde uygulandıklarında referans solüsyondan anlamlı derecede daha az etkili bulundu ($p<0.1$). Set 2 ve 4 çalışmalarında test edilen antiseptikler "2x3 ml; 2x30 sn" şeklinde uygulandı. Wilcoxon testi sonucunda; A, B, C, D, E antiseptikleri ve DSÖ-II formülasyonu toplam 60 saniyelik uygulama şeklinde EN 1500 standardını sağladı.

İRDELEME

Çalışmamızda, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda görev yapan sağlık personeli içinden seçilen 15 gönüllünün katılımı ile beş adet antiseptik ürün ve DSÖ-II formülasyonu EN 1500 standardına göre test edildi. COVID-19 pandemisi nedeniyle kullanımı teşvik edilen alkol bazlı el antiseptiklerinin formülasyon, uygulama şekli, etkinliği ve maliyeti açısından değerlendirilmesinin önemi artmıştır.

Tablo 3. Ortalama Logaritmik Azaltma Faktörü (log AF) Değerleri

Antiseptikler	Set 1 log AF (SS)	Set 2 log AF (SS)	Antiseptikler	Set 3 log AF (SS)	Set 4 log AF (SS)
R	4.24 (0.43)	4.24 (0.48)	R	4.65 (0.52)	3.91 (0.55)
A	3.38 (0.43) *	4.42 (0.48)	C	3.90 (0.42) *	4.68 (0.63)
B	3.56 (0.72) *	4.33 (0.29)	D	3.36 (0.41) *	4.17 (0.59)
DSÖ-II	3.62 (0.33) *	4.79 (0.46)	E	3.89 (0.40) *	4.24 (0.35)

*Otuz saniyelik uygulamada test edilen bütün antiseptikler referans solüsyondan (R) daha az etkili bulunmuştur (Wilcoxon işaretli sıralar testi, $p<0.1$).
SS: Standart sapma

Bu nedenle 2013 yılında yaptığımız çalışmanın verilerini güncel standarttaki değişiklikler ve DSÖ formülasyonları için önerilen modifikasyonlar ışığında sunarak konuya dikkat çekmek istedik.

EN 1500 standardının ilk versiyonu CEN tarafından 1997 yılında yayınlanmış ve TSE tarafından 2001 yılında aynen kabul edilmiştir. CEN, standartta bazı değişiklikler yaparak son versiyonunu Nisan 2013'te kullanılabilir hale getirmiştir (10). Bu son versiyon yine TSE tarafından Haziran 2013'te kabul edilmiş olup halen yürürlüktedir. Çalışmamızda o tarihte geçerli olan ilk versiyon kullanılmıştır.

Piyasadan temin edilen beş adet el antiseptiğinden A, C, D ve E ürünlerinin etiketlerinde hijyenik el antisepsisi için "1x3 ml; 30 sn" şeklinde uygulanmaları önerilmektedir. B ürününün etiketinde ise bu konuda bir bilgi verilmemiştir. DSÖ kılavuzunda, DSÖ-II formülasyonu için belli bir uygulama süresi bildirilmemiş olmakla birlikte alkol bazlı el antiseptikleri ile hijyenik el ovalama süresi 20-30 saniye olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda bütün antiseptikleri hem EN 1500 standardının önerdiği 60 saniyelik hem de daha yaygın olarak önerilen 30 saniyelik uygulama için ayrı ayrı test ettik. Bütün antiseptikler (1x3 ml; 30 sn) şeklinde uygulandıklarında standardı sağlayamamıştır.

DSÖ-II formülasyonunun da standardı sağlayamaması önemli bir bulgudur. Aynı bulgu 2012'de Suchomel ve arkadaşları (11) tarafından yapılan çalışmada da gözlenmiştir. Söz konusu çalışmada, DSÖ-I ve DSÖ-II formülasyonlarının her ikisi de "1x3 ml; 30 sn" şeklinde uygulandığında referans solüsyondan daha az etkili bulunmuştur.

DSÖ kılavuzunda formülasyonların EN 1500 standardına göre referans solüsyonla eşdeğer etkinlikte olduğu ifade edilmiş ancak uygulama süresi ve antiseptik miktarı belirtilmemiştir (1).

A, B ve DSÖ-II antiseptikleri içinde 30 saniye (Set 1) ve 60 saniye (Set 2) uygulamalarında en yüksek log AF değerine sahip olanı %75 (v/v) izopropil alkol içeren DSÖ-II formülasyonudur. Etken madde olarak; A antiseptiği %70 izopropil alkol, B antiseptiği ise ağırlıkça (w/w) %60 izopropil alkol, %0.15 (w/w) benzalkonyum klorür ve %0.1 (w/w) undesilenik asit içermektedir. A antiseptiğinin alkol içeriğinin hacimce ya da ağırlıkça olduğu konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. B antiseptiğinin ağırlıkça ifade edilen alkol içeriği 20°C'de yaklaşık hacimce %70 izopropil alkole denk gelmektedir. Bu oran DSÖ-II formülasyonunun içerdiği miktarın altındadır.

C, D ve E antiseptikleri içinde 30 saniye (Set 3) ve 60 saniye (Set 4) uygulamaları için en etkili olanı %70 (v/v) izopropil alkol içeren C antiseptiğidir. D antiseptiği %70 (v/v) etil alkol ve %10 (v/v) izopropil alkol içermektedir. E antiseptiği %62.14 (w/w) izopropil alkol içermektedir ve hacimce yaklaşık %70'e karşılık gelmektedir. C ve E antiseptiklerinin ortalama log AF değerleri 30 saniyelik uygulamada sırayla 3.90 ve 3.89 iken 1 dakikalık uygulamada sırayla 4.68 ve 4.24 olarak hesaplandı. D ürünü test edilen ürünler içinde 30 saniye ve 1 dakikalık uygulamalarda en düşük log AF değerine sahip antiseptikti (sırayla 3.36 ve 4.17).

EN 1500 standardında önerilen bir dakikalık uygulama süresi sağlık çalışanlarının gerçek hayatta el ovalama için ayırdıkları süreyi yansıtmamaktadır. Birçok çalışmada sağlık çalışanlarının el temizliği için ayırdıkları süre, ortalama 15 sn'den az bulunmuştur (12, 13). Suchomel ve arkadaşları (11), DSÖ tarafından önerilen iki formülasyonu alkol oranlarını yükselterek modifiye etmiştir. Bunun için, DSÖ-I formülasyonundaki hacimce %80 etil alkol yerine ağırlıkça %80 etil alkol; DSÖ-II formülasyonundaki hacimce %75 izopropil alkol yerine ağırlıkça %75 izopropil alkol kullanımını önermişlerdir (DSÖ-I için, %80 (w/w) etil alkol, %0.125 (v/v) hidrojen peroksit ve %1.45 (v/v) gliserol; DSÖ-II için, %75 (w/w) izopropil alkol, %0.125 (v/v) hidrojen peroksit ve %1.45 (v/v) gliserol). Ağırlıkça tanımlanan bu oranlar hacimce yaklaşık %85 etil alkol ve %80 izopropil alkole karşılık gelmektedir. Bu iki modifiye formülü test ederek, her ikisinin de 3 ml ve 30 saniyelik uygulamada EN 1500 standardını sağladıklarını göstermişlerdir.

EN 1500 standardının son versiyonunda ilk versiyondan farklı olarak gönüllü sayısı 12-15'ten, 18-22 kişiye çıkarılmış ve istatistiksel değerlendirme için karşılaştırmalı test modeli yerine eşitsizlik testi modeli kullanılmıştır. İlk versiyonda; kullanılan nötralizanların validasyonu için, el antiseptiklerinin bakterisidal etkinliklerini değerlendirmek amacıyla kullanılmış olan kantitatif ve *in vitro* bir süspansiyon testi olan prEN 12054 standardında (14) tanımlanan yönteme atıf yapılmıştır. prEN 12054 standardı iptal edilmiş olduğu için, son versiyonda nötralizanların validasyonu için ayrı bir başlık açılmış ve prosedür tanımlanmıştır. Ayrıca son versiyonda kullanılabilecek nötralizanların listesi de modifiye edilmiştir. Aktif madde olarak kısa zincirli alkol içeren formülasyonlar, nötralizan kullanılmaksızın sadece TSB dilüsyonu ile nötralize edilebilmektedir (10). Suchomel ve arkadaşları (11), DSÖ formülasyonlarının herhangi bir nötralizan katkısına gerek kalmadan saf sıvı besiyerinin dilüsyonu ile nötralize edildiğini göstermiştir. Ancak alkol dışında çeşitli aktif maddelerin yer aldığı ürünlerde nötralizasyon kritik bir aşamadır. EN 1500 standardının ilk ve son versiyonlarında standart bir nötralizan tanımlanmamış olup farklı aktif maddeler için kullanılabilecek nötralizan kombinasyonları listelenmiştir. Bu nedenle nötralizasyon işleminin valide olduğunun ve bakteri üzerinde toksik etkisi olmadığının gösterilmesi şarttır. Kampf ve arkadaşları (15) tarafından yapılan bir çalışmada, klorheksidin içeren etil alkol bazlı bir antiseptiğin yetersiz nötralizasyonunun yanlış pozitif etkinlik değerlendirmesine neden olabileceği gösterilmiştir. Test ettiğimiz antiseptik ürünler alkol bazlı olup sadece B ürününde benzalkonyum klorür ve undesilenik asit yer

almaktadır. Çalışmamızda nötralizan olarak Tween 80 ile birlikte steril yumurta sarısı kullandık. Steril yumurta sarısı standartta yer alan yumurta lesitini yerine kullanılmış olup elde edilen NTSB'nin prEN 12054 standardındaki yöntem kullanılarak valide olduğu ve bakteri üzerinde toksik etkisi olmadığı gösterildi.

DSÖ formülasyonlarının, cerrahi el antisepsisi uygulaması için yetersiz olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (16, 17). Geçici florayı elimine etmenin yanı sıra kalıcı florayı azaltmayı da hedefleyen cerrahi el antiseptiklerinin değerlendirilmesi için EN 12791 standardı kullanılmaktadır (18). Bu standartta, EN 1500'den farklı bir şekilde yapay olarak kontamine edilmemiş, temiz ellerden ilk değer numuneleri alınmaktadır. Antiseptik ürün uygulandıktan sonra ellerden rastgele seçilmiş birinden hemen son değer numunesi alınırken; havada kuruduktan sonra eldiven giydirilen diğer elden üç saat sonra son değer numunesi alınmaktadır. Böylece antiseptiğin ani etkisi ve devam eden üçüncü saat etkisi birlikte değerlendirilir. Suchomel ve arkadaşları (17), hijyenik el antisepsisi için önerdikleri DSÖ-I ve DSÖ-II modifikasyonlarını bir diğer çalışmalarında EN 12791 standardına göre değerlendirmiştir. Söz konusu çalışmada, uygulama süresini üç dakikadan beş dakikaya çıkardıklarında bu modifikasyonların ani etkisinin EN 12791 standardını sağladığını ancak ani etkide sağlanan bu gelişmenin standartta tanımlanan "üçüncü saat etkisi" üzerinde gözlenmediğini bildirmişlerdir (17). Yine, Suchomel ve arkadaşları (19, 20) tarafından yapılan iki farklı çalışmada da orijinal formülasyondaki yüksek gliserol içeriğinin üçüncü saat etkisi üzerinde olumsuz etkisi olduğu gösterilmiş ve DSÖ formülasyonları için alkol içeriğinin artırılmasının yanı sıra gliserol içeriğinin yarı yarıya azaltıldığı (%0,725 v/v) ikinci bir modifikasyon önerilerek bu modifikasyonun EN 12791 standardını beş dakikalık uygulamada sağladığı gösterilmiştir. Daha güncel olan farklı bir çalışmalarında da gliserol oranını daha da azaltarak (%0.5 v/v) önerdikleri üçüncü modifikasyonun EN 12791 standardını üç dakikalık uygulamada sağladığını göstermişler ve COVID-19 pandemisinde ticari antiseptik ürünlerin temininde yaşanan sıkıntılar nedeniyle kullanımları artan DSÖ formülasyonlarının bir an önce önerdikleri şekilde modifiye edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (8).

Çalışmamızda test ettiğimiz bütün antiseptikler "1x3 ml; 30 sn" şeklinde uygulandıklarında EN 1500 standardını sağlayamamıştır. Bunların "2x3 ml; 2x30 sn" şeklinde uygulanmaları ya da 30 saniyede yeterli el antisepsisi sağlanmak isteniyorsa antiseptiklerin alkol oranlarının yükseltilmesi düşünülebilir. Suchomel ve arkadaşlarının (8, 20) önerdikleri gliserol oranı düşürülmüş ikinci ve üçüncü modifikasyonların, hijyenik el antisepsisinde kullanımı için; EN 1500 standardı ile de değerlendirilmesi ve iyi tolere edilebilecek optimal gliserol oranının belirlenmesi için klinik çalışmalar yapılması yararlı olabilir.

EN 1500 standardı, antiseptiklerin bakterisidal etkinliği ile ilgili bilgi vermekte olup pratik şartlardaki, uygulama süresi ve kullanılan antiseptik hacmi gibi değişkenlerin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere geliştirilmemiştir. Hastane infeksiyonlarını azaltmak amacıyla ürünlerin eldeki bakteri sayısında kaç log'luk bir azalma yapması gerektiği bilinmemektedir. Bunu saptayabilmek için saha çalışmaları yapılması düşünülebilir. Bu çalışmalar pratik olmaktan uzak olsa da EN 1500 ve mevcut diğer standartların şartlarının bilinçli olarak tekrar tanımlanmasını sağlayacaktır.

Hasta Onamı

Standarda uygun olarak, laboratuvar personeli arasından seçilen 15 gönüllünün katılımı ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Gönüllülere çalışma hakkında bilgi verilerek, yazılı onayları alınmıştır.

Etik Kurul Kararı

Çalışma için Uludağ Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 26 Mart 2013 tarih ve 2013-6/5 karar numarasıyla onay alınmıştır.

Danışman Değerlendirmesi

Bağımsız dış danışman.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram – C.Ö., T.T.; Tasarım – C.Ö., T.T.; Denetleme – C.Ö.; Kaynak ve Fon Sağlama – C.Ö.; Malzemeler/Hastalar – C.Ö.; Veri Toplama ve/veya İşleme –T.T.; Analiz ve/veya Yorum – C.Ö., T.T.; Literatür Taraması – C.Ö., T.T.; Makale Yazımı – C.Ö., T.T.; Eleştirel İnceleme – C.Ö., T.T.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek

Yazarlar finansal destek beyan etmemiştir.

Teşekkür

Çalışmaya gönüllü olarak katılan ve teknik destek sağlayan mikrobiyoloji laboratuvarı personeline teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. WHO guidelines on hand hygiene in healthcare [Internet]. Geneva: World Health Organization (WHO). [erişim 18 Ağustos 2021]. https://www.who.int/publications/i/item/9789241597906
2. Picheansathian W. A systematic review on the effectiveness of alcohol-based solutions for hand hygiene. Int J Nurs Pract. 2004;10(1): 3-9. [CrossRef]
3. Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, et al. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme. Lancet. 2000;14;356(9238):1307-12. [CrossRef]
4. Brown SM, Lubimova AV, Khrustalyeva NM, et al. Use of an alcohol-based hand rub and quality improvement interventions to improve hand hygiene in a Russian neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003;24(3):172-9. [CrossRef]
5. Nguyen KV, Nguyen PT, Jones SL. Effectiveness of an alcohol-based hand hygiene programme in reducing nosocomial infections in the Urology Ward of Binh Dan Hospital, Vietnam. Trop Med Int Health. 2008;13(10):1297-302. [CrossRef]
6. European Norm (EN) 1500. Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic handrub.Test method and requirements (phase 2/step 2). Brussels: European Committee for Standardization, 1997.
7. Guide to Local Production: WHO-Recommended Handrub Formulations [Internet]. Geneva: World Health Organization (WHO). [erişim 18 Ağustos 2021]. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-IER-PSP-2010.5
8. Suchomel M, Eggers M, Maier S, Kramer A, Dancer SJ, Pittet D. Evaluation of World Health Organization-recommended hand hygiene formulations. Emerg Infect Dis. 2020;26(9):2064-8. [CrossRef]
9. Kampf G, Scheithauer S, Lemmen S, Saliou P, Suchomel M. COVID-19-associated shortage of alcohol-based hand rubs, face masks, medical gloves, and gowns – proposal for a risk-adapted approach to ensure patient and healthcare worker safety. J Hosp Infect. 2020;105(3):424-7. [CrossRef]
10. European Norm (EN) 1500. Chemical disinfectants and antiseptics - Hygienic handrub - Test method and requirements (phase 2/step 2). Brussels: European Committee for Standardization, 2013.
11. Suchomel M, Kundi M, Pittet D, Weinlich M, Rotter ML. Testing of the World Health Organization recommended formulations in their application as hygienic hand rubs and proposals for increased efficacy. Am J Infect Control. 2012;40(4):328-3. [CrossRef]
12. Gould D, Ream E. Assessing nurses' hand decontamination performance. Nurs Times. 1993;89(25):47–50.

13. Broughall JM, Marshman C, Jackson B, Bird P. An automatic monitoring system for measuring handwashing frequency in hospital wards. J Hosp Infect. 1984;5(4):447-53. [CrossRef]
14. prEN 12054. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of products for hygienic and surgical hand rub and hand wash used in human medicine. Test method and requirements (phase 2/step 1). Brussels: European Committee for Standardization, 1997.
15. Kampf G, Shaffer M, Hunte C. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidine-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. BMC Infect Dis. 2005;5:48. [CrossRef]
16. Kampf G, Ostermeyer C. World Health Organization-recommended hand rub formulations do not meet European efficacy requirements for surgical hand disinfection in five minutes. J Hosp Infect. 2011;78(2):123-7. [CrossRef]
17. Suchomel M, Kundi M, Allegranzi B, Pittet D, Rotter ML. Testing of the World Health Organization-recommended formulations for surgical hand preparation and proposals for increased efficacy. J Hosp Infect. 2011;79(2):115-8. [CrossRef]
18. EN 12791. Chemical disinfectants and antiseptics. Surgical hand disinfection. Test method and requirement (phase 2/step 2). Brussels: European Committee for Standardization, 2005.
19. Suchomel M, Rotter M, Weinlich M, Kundi M. Glycerol significantly decreases the three hour efficacy of alcohol-based surgical hand rubs. J Hosp Infect. 2013;83(4):284-7. [CrossRef]
20. Suchomel M, Kundi M, Pittet D, Rotter ML. Modified World Health Organization hand rub formulations comply with European efficacy requirements for preoperative surgical hand preparations. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013;34(3):245-50. [CrossRef]